

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-073594

(43)Date of publication of application : 17.03.1998

(51)Int.Cl.

G01N 33/543  
A61K 47/30  
C08K 9/04  
C08L 71/02  
C08L101/00  
C09C 1/62  
C09C 3/10  
// A61K 39/44

(21)Application number : 09-148334

(71)Applicant : BOEHRINGER MANNHEIM GMBH

(22)Date of filing : 05.06.1997

(72)Inventor : NICHTL ALFONS DR  
SLUKA PETER DR

(30)Priority

Priority number : 96 19622628 Priority date : 05.06.1996 Priority country : DE

(54) STABILIZATION OF METAL CONJUGATE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To stabilize colloid particles, by the surface of which formed molecules are adsorbed, by using the composition containing polyethylene glycol replaced by thiol or disulfide group adsorbed in combination on the surface of the particles having the specified particle diameter.

SOLUTION: When the composition has the form of aqueous suspension, the replaced polyethylene glycol in buffer solution is adsorbed in combination on the surface of the particles and contained in the dissolved pattern at the same time. At the particle, metallic or carbon particles are used, and noble-metal particles such as gold are recommendable for the metallic particles. As the average diameter of the particles, the diameter in the range of 1-1,000nm is used. The organism molecules, which are adsorbed by the surface of the particles, are selected from the group of protein and the like. The polyethylene glycol, which is replaced by a thiol group or a disulfide group, has the structure of HS-R1 or S-R2-S-R3 [one of organic residues R1 and R2 and R has two or more (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O) groups].

---

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination] 26.06.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than dismissal the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application] 25.09.2002

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-73594

(43)公開日 平成10年(1998)3月17日

(51)Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	5 2 5		G 0 1 N 33/543	5 2 5 W 5 2 5 U
A 6 1 K 47/30			A 6 1 K 47/30	B
C 0 8 K 9/04			C 0 8 K 9/04	
C 0 8 L 71/02			C 0 8 L 71/02	

審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平9-148334	(71)出願人	594057093 ベーリンガー マンハイム ゲーエムベー ハー ドイツ連邦共和国 68305 マンハイム- ワルドホフ, サンドホファー シュトラ- セ 112-132
(22)出願日	平成9年(1997)6月5日	(72)発明者	アルフォンス ニヒトル ドイツ連邦共和国 ディー-82383 ホヘ ンバイサンパーク, ツヴァイクシュトラ- セ 1 ビー
(31)優先権主張番号	1 9 6 2 2 6 2 8 : 7	(74)代理人	弁理士 平木 祐輔 (外2名)
(32)優先日	1996年6月5日		
(33)優先権主張国	ドイツ (D E)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 金属コンジュゲートの安定化

(57)【要約】

【課題】 表面に生体分子が吸着したコロイド粒子を安定化させる。

【解決手段】 表面に生体分子が吸着したコロイド粒子を含む組成物であって、チオールおよび／またはジスルフィド基で置換されたポリエチレングリコールをさらに含有する組成物。この組成物は免疫学的試験方法において検出用試薬として使用することができる。

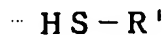
## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 表面に生体分子が吸着したコロイド粒子を含む組成物であって、チオールおよび／またはジスルフィド基で置換されたポリエチレングリコールをさらに含有する組成物。

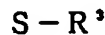
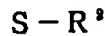
【請求項2】 置換ポリエチレングリコールが粒子の表面に複合吸着している、請求項1記載の組成物。

【請求項3】 粒子が貴金属粒子である、請求項1または2記載の組成物。

【請求項4】 粒子の平均直径が1 nm～1000 nm の範囲である、請求項1～3のいずれか1つに記載された組成物。



または



(I)

(II)

〔式中、残基 $\text{R}^1$  ならびに残基 $\text{R}^2$  および $\text{R}^3$  の少なくとも1つが2以上、好ましくは3以上の $(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})$  基を含有する有機残基である〕を有する、請求項1～6のいずれか1つに記載された組成物。

【請求項8】 置換ポリエチレングリコールが約50,000 Dの最大平均分子量を有する、請求項1～7のいずれか1つに記載された組成物。

【請求項9】 残基 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$  および $\text{R}^3$  が末端基としてOH基および／またはO-アルキル基を有する、請求項7記載の組成物。

【請求項10】 請求項1～9のいずれか1つに記載の組成物の検出用試薬としての使用。

【請求項11】 組織切片の染色のための、請求項10記載の使用。

【請求項12】 コンジュゲートにチオールおよび／またはジスルフィド基で置換されたポリエチレングリコールを添加することからなる、コロイド金属粒子および生体分子で構成されるコンジュゲートの安定化方法。

【請求項13】 置換ポリエチレングリコールを最終濃度が0.1 $\mu\text{M}$ ～1 mMになるように添加する、請求項12記載の方法。

【請求項14】 さらに別の安定剤を追加する、請求項12または13記載の方法。

【請求項15】 検出用試薬として請求項1～9のいずれか1つに記載の安定化組成物を含有する、免疫学的検出方法のための試験用キット。

【発明の詳細な説明】

【請求項5】 生体分子が、タンパク質、糖タンパク質、ペプチド、核酸、ペプチド-核酸、糖類、抗原およびハプテンからなる群から選択される、請求項1～4のいずれか1つに記載された組成物。

【請求項6】 生体分子が、抗体、抗体断片、レクチン、酵素、ストレプトアビジン、アビジン、プロテインA、組み換えポリペプチド、ペプチド、ハプテンおよびポリハプテンからなる群から選択される、請求項5記載の組成物。

【請求項7】 置換ポリエチレングリコールが下記の一般式の構造：

【化1】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は生体分子が粒子の表面に吸着されている、水溶液中のコロイド粒子の懸濁物を含む組成物に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】 タンパク質または核酸などの生体分子とコロイド粒子で構成されるコンジュゲートは、例えばイムノアッセイなどの検出法におけるマーカーとして、または遺伝子転移のためのマイクロプロジェタイル(microprojectile)として、診断および治療法において広く使用されている。粒子として、金属および金属酸化物、金属水酸化物、金属塩などの金属化合物、ならびに金属または金属化合物で被覆されたポリマー核物質で構成される粒子を使用することができる(例えば、マーカーとしての適用に関して、米国特許第-4,313,734号;Leuvingら、J.Immunoassay 1 (1980),77-91;Leuving Dissertation(1984),Sol Particle Immunoassay(SPIA):各種のイムノアッセイにおける標識抗体としての抗体被覆粒子の使用(The Use of Antibody Coated Particles as Labelled Antibodies in Various Types of Immunoassay);Uda ら、Anal.Biochem. 218(1994),259-264, 独国公開公報第 41 32 133号,3ページ,16-18 行、および遺伝子転移のための適用に関して、Tangら、Nature 356(1992),152-154;Eisenbraunら、DNA and Cell Biology 12(1993),791-797;Williamsら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88(1991),2726-2730, 参照)。さらに、炭素粒子などの非金属コロイド粒子(van

Amerongen, Anabiotic '92(1993), 193-199) もまた使用することができることも知られている。現在はコロイド金粒子が最も頻繁に使用される。

【0003】生体分子-金コンジュゲートを製造するため、最初に、一般的に知られた方法にしたがって、テトラクロロ金を還元することによって、金ゾルを製造する。続いてこの金ゾルに、それぞれ所望の生体分子、例えば抗体、プロテインA、タンパク質G、ストレプトアビジン等のタンパク質を添加する。それぞれの添加条件(pH、緩衝液、生体分子の濃度等)は、生体分子の当電点、MPA(最少保護量)および/またはそのコンジュゲートの特定の用途に依存する(例えば、DeMey, 金プローブの製造および使用(The Preparation and Use of Gold Probes): J.M.Polak and S.V.Noorden 編集: Immunocytochemistry, Wright, Bristol 1986, 115-145ページ、ならびにJ.E.Beasley, コロイド金: A New Perspective for Cytochemical Marking, Microscopy Handbooks 17, Oxford University Press, 1989, 特に1-14ページ参照)。これらの文献の開示をここに明白に引用する。

【0004】コロイド粒子にそれぞれ所望の生体分子を添加した後、コンジュゲートを安定化させる必要がある。この安定化は、粒子の凝集を最少にすること、および吸着の可能性を残している自由表面を飽和することを目的としている。現技術水準において、安定剤として、例えばウシ血清アルブミン、血液置換混合物等の不活性タンパク質、Tween(登録商標)20などの界面活性剤、ポリエチレングリコール(分子量20,000D)、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリビニルスルフェートなどの水溶性合成ポリマー、デキストランおよびゼラチンが使用されている(例えばDeMey, 上記; Beasley, 上記; Behnke, Eur. J. Cell Biol. 41(1986), 326-338; DE 24 20 531 C3; およびMeiselら, J. Phys. Chem. 85(1981), 179-187参照)。さらに、ホスパン(phosphane)複合体リガンドによる金ゾルの安定化の可能性についても述べられている(Schmidら, Z. Naturforsch. 45b(1994), 989-994)。

【0005】現技術水準において使用されている安定剤は金属粒子の自由表面に吸着状態で結合する。この安定剤は、長期の保存、または例えば試料(血液、血清、血漿、尿)との接触、試験片フリースへのコンジュゲートの組み込み等によって試験中に発生し得るものなどの環境条件の変化の結果として、多かれ少なかれ表面から脱着するかまたは置換される可能性がある。この結果として、凝集に対する安定性の劣化および非特異的反応性の増加がもたらされる。その上、使用する安定剤の大部分が確定性に乏しい生成物であり、その中でも例えばウシ血清アルブミンおよびゼラチンなどは変化しやすい特性を有している。その結果、安定化効果の変化もまた生じることがある。

【0006】粒子表面への吸着過程は非常に複雑で、現

在のところ部分的にしかわかっていない。吸着は静電的相互作用、ファンデルワールス力および疎水性相互作用が組み合わされた結果として生じるものと仮定されている(Beesely, 上記)。この過程において、吸着される生体分子の種類によって、結合の1つの型または別の型が優勢となり得る。

【0007】Prime およびWhitesidesによる公表文献(Science 252(1991), 1154-1167)において、疎水性(メチル末端)および親水性(ヒドロキシル末端、マルトース末端およびヘキサエチレングリコール末端)アルカンチオールの混合物が平面状の金表面へのタンパク質の吸着を抑制し得ることが開示されている。アルカンチオールによるタンパク質吸着の安定化については開示も示唆もされていない。

【0008】驚くべきことに、チオールおよび/またはジスルフィド基で置換されたポリエチレングリコールが生体分子-粒子コンジュゲートの安定化に対して非常に好適であることが今回見出された。現技術水準の安定剤に比較して、置換ポリエチレングリコールが粒子表面により強く結合する結果、コンジュゲートの安定性に関して確実な改善が達成されることとなる。これによって、溶液中での長期安定性の改善および低凝集傾向、環境条件の変化に対するよりよい安定性、および例えばクロマトグラフィー特性などの試験性能の改善がもたらされる。置換ポリエチレングリコールによって生体分子が置換される、または置換ポリエチレングリコールと生体分子間に生じ得る相互作用(例えば、生体分子のSH基および置換ポリエチレングリコールのSH基間の相互作用)などによる、試験中のコンジュゲートの機能への悪影響をとまわずにこれらの改善が達成されることは、特に驚くべきことであった。対照的に、置換ポリエチレングリコールを使用した場合、多くの試験形式において、検出限界の低下および/または動力学的幅の強化(検出曲線の急勾配化)が生じ得るという、改善された試験性能すら見られる。これに適した安定剤は、例えば2以上のエチレンオキサイド単位を有する短鎖の確定された置換ポリエチレングリコール、統計的なモル質量分布を有する高分子量置換ポリエチレングリコール、およびこれらの混合物である。

【0009】

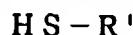
【課題を解決するための手段】したがって、本発明の1主題は、表面に生体分子が吸着されたコロイド粒子を含む組成物であって、好ましくはこの粒子の表面に複合吸着されるチオールおよび/またはジスルフィド基で置換されたポリエチレングリコールをさらに含有する組成物である。

【0010】本発明による組成物は水性懸濁物として、または例えば吸収性紙などのクロマトグラフィー材料上に固定化させて存在させることができる。組成物が水性懸濁物の形態の場合、緩衝液中の置換ポリエチレングリ

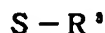
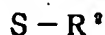
コールを粒子の表面に複合吸着させるとともに溶解形態でさらに含有させるのが好ましい。粒子は金属性または炭素粒子などの非金属性粒子とすることができる。金属、金属酸化物、金属水酸化物、金属化合物の粒子、または金属若しくは金属化合物で被覆された粒子などの金属性粒子が好ましい。金属の粒子が特に好ましい。

【0011】金属の粒子は例えば金、銀、銅、白金、パラジウムからなる群から選択される金属およびこれらの混合物などの貴金属粒子が好ましい。金粒子が特に好ましい。粒子の平均直径は現技術水準において通常の1～1000 nmの範囲であり、適用目的にしたがって変更することができる。粒子の平均直径は好ましくは2-200 nmの範囲であり、特に好ましくは2～100 nmである。

【0012】粒子の表面に吸着される生体分子は、好ましくはタンパク質、糖タンパク質、ペプチド、核酸、ペプチド-核酸、糖類、抗原およびハプテンからなる群から選択される。生体分子は特に好ましくは抗体、抗体断片、レクチン、酵素、ストレプトアビジン、アビジン、プロテインA、組み換えポリペプチドまたは多重抗原(W096/03652)、例えばポリハプテン(デキストランなどの担体またはタンパク質に結合した数種のハプテンまたはペプチド)などの抗原、ペプチドおよびハプテン



または



【0016】[式中、残基 $R^1$ ならびに残基 $R^2$ および $R^3$ の少なくとも1つが2以上、好ましくは3以上の $(CH_2-CH_2-O)$ 基を含有する有機残基である]。エチレンオキシド単位を含有する置換ポリエチレングリコールの残基 $R^1$ 、 $R^2$ および $R^3$ は好ましくは化合物が約50,000 Dの最大平均分子量、特に好ましくは約25,000 Dの最大平均分子量を有するように選択される。残基 $R^1$ 、 $R^2$ および $R^3$ は所望のいずれの基でもよいが、好ましくはOH基および/またはO-メチル若しくはO-エチル基などのO- $C_1 \sim C_4$ アルキル基などのO-アルキル基である。

【0017】好適な置換ポリエチレングリコールの好ましい例は、Shearwater Polymers Inc.から市販されている平均分子量が約5,000 Dのメトキシポリエチレングリコール-SHである。他方、例えば2～10のエチレンオキシド単位を含有する短い確定されたチオール置換またはジスルフィド置換ポリエチレングリコールを使用することも可能である。

(好ましくはビオチン、フルオレセインまたはジギキセニンなどの $MW \leq 1500$ の低分子量物質)からなる群から選択される。これらの生体分子を金粒子に吸着させるための正確な条件については、De MeyおよびBeesleyによる上記の参考文献を引用する。

【0013】安定剤として好適なチオールで置換したポリエチレングリコールは、チオール基を鎖の少なくとも1つの末端に有する基本的に直鎖状の分子が好ましい。一方の末端がチオール基であって、他の末端はチオールおよびジスルフィド以外であるものが好ましい。安定剤として好適なジスルフィドで置換されたポリエチレングリコールもまた、鎖内に少なくとも1つのSS架橋を含有する基本的に直鎖状の分子が好ましい。この分子は、SS架橋をただ1つのみ有し、末端はチオールおよびジスルフィド以外であるものが好ましい。ジスルフィド置換およびチオール置換化合物の混合物もまた安定剤として好適である。

【0014】したがって、チオール基および/またはジスルフィド基で置換されたポリエチレングリコールは好ましくは下記の一般式の構造を有する：

【0015】

【化2】

(I)

(II)

【0018】本発明による組成物は、検出用試薬として、特に免疫学的検出用試薬として使用することができる。第1の好ましい態様において、検出用試薬はイムノアッセイ、すなわち試料液体中の被検体を免疫学的方法、例えば標識被検体類似体若しくは標識被検体-特異的受容体、例えば抗体を使用する競合検定、または標識被検体-特異的受容体若しくはこの被検体-特異的受容体に結合することができる追加の標識受容体を使用するサンドイッチ検定、によって測定するための方法、において使用される。好ましい例は、例えばヒトコリオゴナドトロピン(HCG)の検出試験などの妊娠試験、またはコカイン若しくはアンフェタミンなどの薬物、ヒト血清アルブミン、トロポニンT、ミオグロビンおよび抗HIV抗体などの免疫グロブリンの検出方法である。特に好ましい適用形態は、検出用試薬を含有する吸収性物質、例えば試験片に判定すべき試料を適用するものである。本発明による安定化組成物を使用することができる、第2の特に好ましい態様は、組織切片の染色であ

る。

【0019】その他、本発明による組成物は、例えば遺伝子転移などの生体分子-粒子コンジュゲートに関して既知のその他のすべての適用に対してももちろん使用することができる。本発明のさらに別の主題は、コンジュゲートにチオール基および/またはジスルフィド基で置換されたポリエチレングリコールを添加することからなる、コロイド粒子および生体分子で構成されるコンジュゲートの安定化方法である。この方法において、コンジュゲートの長期安定性の増強(>1.5年)およびpH安定性の改善、そして他の物質の存在に対する安定性の改善を達成することが可能である。

【0020】置換ポリエチレングリコールは好ましくは最終濃度が0.1 $\mu$ Mから1mMとなるように、特に1 $\mu$ Mから100 $\mu$ Mとなるような量を添加する。さらに、例えばウシ血清アルブミンなどの不活性タンパク質および/または非置換ポリエチレングリコールなどの現技術水準において既知の安定剤を追加することができる。

【0021】最後に、本発明は検出用試薬として本発明にしたがって安定化された組成物を含有する、免疫学的検出方法のための試験用キットにも関する。図面および以下の実施例によって本発明をさらに明らかにする。

【0022】

【発明の実施の形態】

#### 実施例1

チオール置換ポリエチレングリコール化合物の合成  
テトラエチレングリコールモノメチルエーテル(Kodak Co.) 25gをピリジン150ml中で塩化トシル 25gと反応させた。反応混合物を水で希釈し、続いて酢酸エチルで抽出した。濃縮によって得られたトシル化物(13g)をDMF中でフタルイミドカリウム塩 15gと150°Cで反応させた。反応混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。ロータリーエバポレーションの後、得られた生成物(10.2g)をメタノール 50ml中にとり、濾過し、ヒドラジン水和物 1.83mlと混合した。混合物を還流下で2時間沸騰させ、冷却し、濃塩酸と混合し、析出した沈殿を濾過によって除去した。

【0023】濾液を3N NaOHでアルカリ性にし、続いてクロロホルムで抽出した。ロータリーエバポレーションの後、粘性油状物 3.11gを得た。この油状物 500mgをTHF 10ml中のトリエチルアミン 244mgで溶解した。この溶液に、THF 20ml中のS-アセチルチオプロピオン酸-O-スクシンイミドエステル 591mgを滴下した。この溶液を室温で24時間攪拌し、ロータリーエバポレーションし、シリカゲルカラム上で精製した。

【0024】アセチル基を切断してチオール基を遊離させるため、生成物 550mgの水溶液に25%アンモニア溶液 15mlを添加した。調製物をカラムクロマトグラフィーによって精製した。モノメトキシテトラエチレングリ

コールプロピオンアミド-SH化合物 300mgを得た。

#### 実施例2

タンパク質-金コンジュゲートの製造

金粒子に吸着させるタンパク質の溶液を好適な添加用緩衝液に対して透析するか、またはこの添加用緩衝液で希釈した。続いて、凝集物が生成した場合には遠心分離または0.2 $\mu$ m 濾紙を通した濾過によって除去した。

【0025】K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を使用して、コロイド金粒子を含有する溶液のpH値をタンパク質溶液のpH値に調整した。その後、攪拌しながら、そのタンパク質にこのコロイド金溶液を添加した。この方法によって調製されたタンパク質-金コンジュゲートを、現技術水準にしたがって、最終濃度が0.1%~1%(w/v)となるようにBSA溶液を添加するか、または最終濃度が0.01%~0.1%(w/v)となるようにポリエチレングリコール溶液を添加することによって、安定化した。

【0026】続いて、このタンパク質-金コンジュゲートを精製し、濃縮して、所望の保存用緩衝液条件、例えば20mM Tris、100mM NaCl pH 8、1%BSAおよび/または0.01%~0.1%PEG、NaN<sub>3</sub>、を設定した。

#### 実施例3

PEGに比較したPEG-SHによる金ゾルの予備飽和  
20nmの金粒子に対してモノクローナル抗ヒト血清アルブミンマウスIgG抗体を添加する前に、10<sup>-5</sup>M PEG-SH (Shearwater Polymers, Inc.からの市販PEG-SH MW 5000、または実施例1のPEG-SH)またはPEGを添加することによって、実施例2の金ゾルを予備飽和した場合、PEGは金ゾルから抗体によって置換されるが、PEG-SHは置換されないことがわかった。

#### 【0027】実施例4

ヒト血清アルブミンおよびHCGの検出のための試験における、本発明にしたがって安定化させたタンパク質-金コンジュゲートの適用

実施例2に記載した方法によって、金粒子上にモノクローナル抗ヒト血清アルブミンおよび抗HCG抗体のコンジュゲートを調製した。コンジュゲートを形成させた後、PEG-SHを最終濃度が10<sup>-6</sup>M~10<sup>-4</sup>Mとなるように添加することによって安定化させた。

【0028】抗体の添加直後にゾル安定剤としてPEG-SHを添加した場合、抗体添加直後に安定剤としてPEG-SHおよびBSAを(順次または混合物として)添加した場合、および保存用緩衝液に安定剤としてPEG-SHを添加した場合(最終濃度10<sup>-4</sup>M 3~10<sup>-6</sup>M)、について試験した。試験は競合1段階試験として、試験片上で実施した。

【0029】モノクローナル抗HSA抗体および金粒子で構成されたコンジュゲートの機能はPEG-SHでの安定化によって悪影響を受けないことがわかった。

**実施例5**

PEG-SHによって安定化された金コンジュゲートの安定性

実施例4において調製した抗体-金コンジュゲートを1.5年間保存した後に測定した結果、抗体が流出せずに、機能がそのまま完全に残っていることが示された。

**【0030】実施例6**

抗体-金コンジュゲートのpH安定性

実施例2に記載した方法にしたがって、モノクローナル抗HCGマウスIgG抗体を40nmの金粒子に吸着させた。続いて、表1a、1bおよび1cに記載されたようにして、再飽和を実施した。

【0031】HClまたはNaOHによって各種のpHに調整しておいた含浸用緩衝液(50mM HEPES pH7.0, 100 mM NaCl, 2.0%ショ糖、0.1%BSA, 0.2%Brij 35)中で、これらのコンジュゲートの安定性を試験した。

試験操作法：試験用金コンジュゲートの全部について5

20nmにおける実際のODを測定した。その後、各バッチを各種pH値の5種の含浸用緩衝液でODが約8になるまで希釈し、直後に、そして1時間後および6時間後に光度計で再測定した。

【0032】表1aは、最終濃度が0.05%となるようにPEG 20,000を添加し、続いて最終濃度が1μMとなるようにPEG-SHを添加することによって安定化した、本発明の抗体-金コンジュゲートに関する結果を示している。表1bは、最終濃度が1μMとなるようにPEG-SHを添加することによって安定化した、本発明の別の抗体-金コンジュゲートに関する結果を示している。

【0033】表1cは、最終濃度が0.05%となるようにPEGで飽和することによって安定化した、現技術水準の抗体-金コンジュゲートに関する結果を示している。

【0034】

【表1】



表1 a

コンジュ ゲート原 液のpH 値	含浸用緩 衝液のp H値	OD 8に 希釈後の pH値	コンジュ ゲート原 液のOD	希釈直後 のOD	1時間後 のOD	6時間後 のOD
8.5	4.3	6.7	19.97	8.3	8.2	8.4
	5.3	7.1		8.3	8.2	8.4
	7.0	7.6		8.3	8.3	8.5
	7.5	8.2		8.2	8.3	8.4
	8.2	8.9		8.3	8.3	8.4

表1 b

コンジュ ゲート原 液のpH 値	含浸用緩 衝液のp H値	OD 8に 希釈後の pH値	コンジュ ゲート原 液のOD	希釈直後 のOD	1時間後 のOD	6時間後 のOD
8.5	4.3	6.7	21.49	8.4	8.4	8.5
	5.3	7.1		8.5	8.5	8.6
	7.0	7.6		8.4	8.4	8.5
	7.5	8.2		8.5	8.6	8.6
	8.2	8.9		8.3	8.2	8.5

表1 c

コンジュ ゲート原 液のpH 値	含浸用緩 衝液のp H値	OD 8に 希釈後の pH値	コンジュ ゲート原 液のOD	希釈直後 のOD	1時間後 のOD	6時間後 のOD
8.6	4.5	6.6	20.20	8.1	6.4	5.2
	4.8	7.4		7.8	6.4	6.2
	5.2	7.5		7.9	7.3	7.3
	6.0	7.8		8.1	8.0	8.1
	7.5	8.0		7.9	8.0	8.1
	8.8	8.6		8.0	8.0	8.2

これらの結果は、現技術水準の金コンジュゲートの場合、酸性および中性pH範囲において、すでに1時間後に注目すべき不安定性（ODの減少）が観察されることを示している。対照的に、本発明のコンジュゲートのODは一定のままである。このことは、本発明のコンジュゲートが現技術水準のコンジュゲートに比較してかなり改善されたpH安定性を有することを示している。

#### 【0035】実施例7

本発明の抗体-金コンジュゲートの試験機能の現技術水準のコンジュゲートに対する比較

ポリクローナル抗アンフェタミンヒツジIgG抗体および20nmの金粒子で構成されたコンジュゲートを調製した。0.1%BSAの添加によって再飽和を実施した。保存用緩衝液に2%BSAを含有させた。

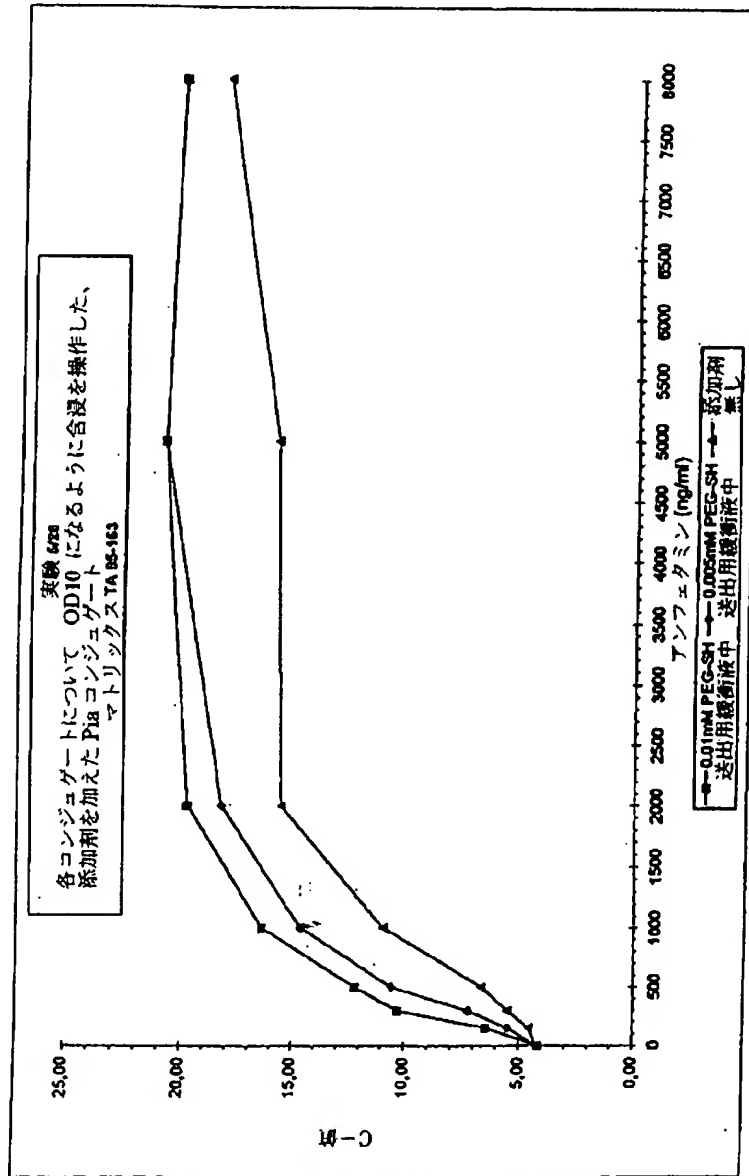
【0036】本発明のコンジュゲートを安定化するため、再飽和後または保存用緩衝液に $5 \times 10^{-6}$ Mまたは $10^{-5}$ M PEG-SHを添加した。競合1段階試験として、試験片上でアンフェタミンの検出を実施した。この実験の結果を図1に示す。PEG-SHを添加しなかった金コンジュゲートの方がかなり緩やかな試験曲線を有し、

すなわち本発明にしたがってPEG-SHで安定化したコンジュゲートよりも試験機能が劣っていることがわかる。5×10<sup>-6</sup>MのPEG-SH添加よりも、10<sup>-5</sup>MのPEG-SH添加の方がさらに大きな改善をもたらす。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明にしたがって安定化させた抗体-金コンジュゲートの現技術水準のコンジュゲートとの試験性能の比較を示す図である。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

C08L 101/00

C09C 1/62

3/10

識別記号

庁内整理番号

FI

C08L 101/00

C09C 1/62

3/10

技術表示箇所

// A 6 1 K 39/44

A 6 1 K 39/44

(72)発明者 ベーター スルカ  
ドイツ連邦共和国 ディー-82362 ヴァ  
イルハイム, シュトラセーアナーヴェク  
17